

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-206826

(43)公開日 平成6年(1994)7月26日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I  
A 61 K 35/74 A B D A 7431-4C  
A B H A 7431-4C

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-313268

(22)出願日 平成4年(1992)11月24日

(71)出願人 592242408

財団法人京都バストゥール研究所  
京都市左京区田中門前町103番地の5

(71)出願人 592242419

信和薬品株式会社  
富山市新庄町237

(71)出願人 392008541

日東薬品工業株式会社  
京都府京都市向日市上植野町南開35-3

(72)発明者 岸田 純太郎

京都市右京区龍安寺衣笠下町35

(74)代理人 弁理士 杉本 勝徳 (外1名)

(54)【発明の名称】 免疫機能助長剤

(57)【要約】

【目的】毒性が少なく、インターフェロン産生を高めて人の免疫機能を助長し、安全に感染症や腫瘍の治療や予防を行うことができる免疫機能助長剤を提供することを目的としている。

【構成】漬物などに由来するラクトバチルス・ブレービス (*Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans*) 菌を純粋培養して凍結乾燥させた粉末を主成分として含ませるようした。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ラクトバチルス・ブレービス菌粉末を含む免疫機能助長剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、インターフェロン産生を高めて人の免疫機能を助長する免疫機能助長剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】インターフェロン（IFN）は、ウィルスに接触した細胞（白血球や纖維芽細胞、Tリンパ球等）から産生され、他の細胞をウィルスから守る作用を持つ物質であって、ウィルスの増殖阻止効果をもつ。このIFNのうち、たとえば、IFN $\alpha$ （ $\alpha$ 型インターフェロン）の産生能は、癌患者や糖尿病患者、前白血病等の疾患で低下していることが報告され、易感染症との相関が明らかにされている。

【0003】またIFN $\gamma$ （ $\gamma$ 型インターフェロン）の産生能も担癌患者、低ガンマグロブリン症の患者で低下し、自己免疫疾患である橋本病の患者で昂進していることが報告され、IFN $\gamma$ 産生能もまたIFN $\alpha$ 産生能とは別のヒトの免疫機能を反映していることが明らかにされている。したがって、IFN $\alpha$ 、 $\gamma$ 産生能の測定は、各個人固有の免疫能を反映する有効なパラメーターであると考えられる。

【0004】すなわち、このように免疫能を反映するいくつかのパラメーターが低下しているとき、それを上昇させることは患者の病態や生活の質向上につながると考えられる。そのため、免疫能を上げる方法として、IFNの投与やOK432等の強力な免疫賦活剤の利用が図られている。

【0005】特に、IFNの投与によれば、担癌患者の状態とも相関していること言われているナチュラルキラー（NK）活性も、上昇することがよく知られている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかし、IFNやOK432等の強力な免疫賦活剤を連続して使用することは、体のホメオタシスの搅乱や、発熱、倦怠感等の副作用をもたらす。そこで、IFNを直接投与するのではなく、人体内でインターフェロン産生を高めて免疫機能を助長させる免疫機能助長剤（インターフェロン誘導剤）の研究が進められ、たとえば、この免疫機能助長剤として、二重鎖RNA、ビラン共重合体等の陰イオン性高分子や各種多糖体（特公平3-9882号公報等参照）がすでに提案されている。

【0007】しかし、これら公知の免疫機能助長剤は、本来人体内に存在しないもので、大なり小なり毒性等があり、インターフェロン産生を高めて感染症や腫瘍の治療を行おうとすれば、その毒性等により副作用が起きる心配がある。本発明は、このような事情に鑑みて、毒性

が少なく、インターフェロン産生を高めて人の免疫機能を助長し、安全に感染症や腫瘍の治療や予防を行うことができる免疫機能助長剤を提供することを目的としている。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明にかかる免疫機能助長剤は、このような目的を達成するために、ラクトバチルス・ブレービス (*Lactobacillus brevis* subsp. *cagulans*) 菌粉末を含んでいることを特徴としている。上記構成において、ラクトバチルス・ブレービス菌粉末は、特に限定されないが、たとえば、以下のようにして製造することができる。

【0009】まず、種菌を下記成分のA～Cの培地に入れ、25℃～35℃で100rpmの速度で攪拌しつつ18～40時間培養する。そして、培養液を濃縮するか、遠心分離したのち、凍結乾燥して得ることができる。

## 培地（A）

① 酵母エキス	0. 5%
② ブドウ糖	1. 5%
③ リン酸二水素カリウム	0. 5%
④ リン酸水素ナトリウム	2. 0%
⑤ 塩化ナトリウム	0. 425%
⑥ 水酸化ナトリウム	0. 0375%
⑦ 脱脂大豆抽出液	8. 75%
⑧ 沈降炭酸カルシウム	0. 1%

但し、①～⑦をまず水に加えて加温溶解し、さらに⑧を加え、この液をpH 6.8～7.0に調整した後、121℃で15分間高压蒸気滅菌した。

【0010】なお、⑦の脱脂大豆抽出液は、塩酸で約0.25Nにした水に脱脂大豆を入れ、ペプシンを加えて約37℃で40～48時間ときどき掻き混ぜながら放置し、消化させる。消化後、水酸化ナトリウムを加え、よく混合して中和する。その液を遠心分離した後、上澄液をとり、脱脂大豆抽出液とした。

## 培地（B）

ポリヘプトン	0. 5～1. 0%
酵母エキス	0. 5～1. 0%
ブドウ糖	0. 5～1. 0%
pH	6. 5～7. 0

## 培地（C）

酵母エキス	0. 55%
ブドウ糖	1. 10%
ポリヘプトン	1. 25%
リン酸二水素ナトリウム	0. 025%
リン酸一水素ナトリウム	0. 025%
硫酸マグネシウム	0. 01%
硫酸マンガン	0. 0005%
硫酸第一鉄	0. 0005%
pH	6. 5～7. 0

50 なお、上記培養の種菌となる菌は、漬物などの食品から

採ることが好ましい。

【0011】因に、上記A～Cのいずれかの培地を用い、上記培養条件で培養すると、50リットルの培養で、1g当たり $20 \sim 500$ 億個( $2 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 個/g)の菌末が $100 \sim 500$ g生産できる。また、このようにして得た菌末の人への投与方法は、特に限定されないが、たとえば、散剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤等にして経口投与することが好ましい。

【0012】因に、錠剤にする場合には、菌末を分散媒としてのL-グルタミン酸ナトリウム(10%)または脱脂粉乳(10%)、L-グルタミン酸ナトリウム(1%)と、賦形剤としての乾燥バレイショ澱粉等と共に混合して製造することができる。

### 【0013】

【実施例】以下に、本発明の実施例を詳しく説明する。  
 (実施例1) 酸茎漬から得た種菌を前述の培地(A)に入れ、 $25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ で $100\text{rpm}$ の速度で攪拌しつつ

30時間培養したのち、遠心分離機に培養液を入れて約 $10000\text{rpm}$ で遠心分離したのち、凍結乾燥して菌体(ラクトバチルス・ブレービスPK株)を得た。

【0014】得られた菌体は、乳酸菌(*Lactobacillus*)が有する以下(1)～(6)の項目に適合するとともに、表1に示すとおり、糖分解性もラクトバチルス・ブレービス菌とほぼ一致した。

- (1) グラム陽性の桿菌である。
- (2) 培地中の炭酸カルシウムに溶解する。

【0015】(3) 培地中のブドウ糖より乳酸を生成する。

- (4) 硝酸塩還元能は陰性である。
- (5) ゼラチン分解性は陰性である。
- (6) カゼイン分解性は陰性である。

### 【0016】

#### 【表1】

5

6

	1回目	2回目		1回目	2回目
Arabinose	+	+	Cellobiose	-	-
Xylose	+	+	Lactose	-	-
Rhamnose	-	-	Trehalose	-	-
Sorbose	-	-	Melibiose	±	+
Ribose	±	+	Raffinose	-	-
Glucose	+	+	Melezitose	-	-
(gas)	+	+	Starch pH		-
Mannose	-	-	Mannitol	-	-
Fructose	+	+	Sorbitol	-	-
Galactose	+	+	Esculin pH		-
Sucrose	-	-	Salicin		-
Maltose	+	+	Amygdalin		-

【0017】次に、上記で得た菌体に乾燥バレイショ澱粉を加え、きんすうが $10^8 \sim 10^9$  個になるように調製し、さらに賦形剤として無水乳糖を加えて、1粒250mgの錠剤を得た。そして、健康な25才～65才の男性4名、女性6名のボランティアに上記で得た錠剤を1日6粒、菌数にして $3 \times 10^8$  個を4週間連続して投与するとともに、投与前、投与後2週間目、投与後4週間にそれぞれ血液を採取してIFN $\alpha$ 産生、IFN $\gamma$ 産

生、ナチュラルキラー活性（NK活性）および2-5A（2' 5' オリゴアデニル酸）酵素活性を測定し、その結果を表2および表3に示した。

【0018】なお、IFN $\alpha$ 産生およびIFN $\gamma$ 産生は、以下のようにして測定用サンプルを作製し、FL（ヒト羊膜由来）細胞、シンドビス ウィルス（Sindbis virus）を用いた50% CPE（細胞変性効果）抑制によるバイオアッセイ法により測定した。

(IFN $\alpha$ 測定用サンプル) 患者よりヘパリン採血した血液を全血法によるIFN誘導のための処理をしたのち、この血液をそのままスピッツ管2ml分取し、最終的に500HA/mlとなるようにHVJ(センダイ・ウィルス(Sendai virus))を添加し、37℃で20時間培養後、3000rpmで遠心分離し、その上澄みを回収し、IFN $\alpha$ 測定用サンプルとした。

【0019】(IFN $\gamma$ 測定用サンプル) IFN $\alpha$ 測定用サンプルの場合と同様にして採血した血液をイーグルMEM培地で4倍に希釈後、25μg/mlとなるようPHA-P(sigma社製フォトヘムアグリチニン(Photohemagglutinin))を入れ48時間、37℃にて培養し、この培養液を遠心分離した上澄みを回収し、IFN $\gamma$ 測定用サンプルとした。

【0020】また、NK細胞活性の測定は、ヘパリン採\*

\*血後の血液をFicoll-paque比重遠心法により末梢血単核球を分離し、エフェクター細胞とした。標的細胞にはCr<sup>51</sup>をラベルしたK562細胞を用い、E(エフェクター細胞(effectector cell)) / T(標的細胞(target cell))比20:1で混合し、定法にしたがって細胞障害活性を測定した。

【0021】さらに、2-5A酵素活性の測定は、無刺激の末梢血からは測定できないので、今回はIFN $\alpha$ 産生能測定のためにHVJ(センダイ・ウィルス(Sendai virus))刺激20時間後の検体を測定した。測定は2-5A合成酵素活性測定用ラジオイムノアッセイキット(栄研化学社製)を用い、血漿中の2-5A酵素活性を測定した。

【0022】

【表2】

	IFN $\alpha$ 産生 IU/ml			IFN $\tau$ 産生 IU/ml		
	0	2W後	4W後	0	2W後	4W後
KU 女	5518 100.0	9545 173.0	9884 179.1	84 100.0	145 172.6	358 426.2
UY 女	6457 100.0	10784 167.0	21986 340.5	323 100.0	338 104.6	705 218.3
AK 女	5254 100.0	15073 286.9	10584 201.4	424 100.0	402 94.8	353 83.3
YH 女	7243 100.0	4162 57.5	5712 78.9	243 100.0	185 76.1	309 127.2
TU 男	5208 100.0	5511 105.8	6141 117.9	506 100.0	960 189.7	270 53.4
TS 男	7240 100.0	12693 175.3	9999 138.1	234 100.0	110 47.0	110 47.0
TO 男	6495 100.0	7229 111.3	10617 163.5	69 100.0	60 87.0	137 198.6
YN 女	4418 100.0	9083 205.6	4416 100.0	75 100.0	31 41.3	62 82.7
AH 女	3168 100.0	7345 231.8	10320 325.8	32 100.0	87 271.2	98 306.3
MS 男	11620 100.0	22075 190.0	9939 85.5	126 100.0	12 9.5	41 32.5
平均	6262.1 100.0	10350 165.3	9959.8 158.0	211.6 100.0	233 110.1	244.3 112.8

【0023】

【表3】

9

10

	N K 活性 %			2 - 5 A 活性 pmol / ml		
	0	2 W後	4 W後	0	2 W後	4 W後
K U 女	26 100.0	50 192.3	47 180.8	29.4 100.0	32.0 108.8	22.1 75.2
U Y 女	43 100.0	62 144.2	59 137.2	49.3 100.0	41.5 84.2	45.9 93.1
A K 女	42 100.0	33 78.6	42 100.0	10.0 100.0	61.0 610.0	45.2 452.0
Y H 女	42 100.0	51 121.4	51 121.4	10.0 100.0	22.6 226.0	66.3 663.0
T U 男	24 100.0	30 125.0	31 129.2	22.8 100.0	48.4 212.3	45.0 197.4
T S 男	33 100.0	89 269.7	36 109.1	84.9 100.0	102.5 120.7	119.8 141.1
T O 男	53 100.0	62 117.0	63 118.9	47.5 100.0	61.8 130.1	103.2 217.3
Y N 女	36 100.0	44 122.2	62 172.2	54.8 100.0	323.5 590.3	792.4 1446.0
A H 女	42 100.0	79 188.1	53 126.2	45.0 100.0	53.1 118.0	118.9 264.2
M S 男	54 100.0	79 146.3	63 116.7	84.0 100.0	99.8 118.8	108.7 129.4
平均	39.5 100.0	57.9 146.6	50.7 128.4	43.8 100.0	58.1 132.6	75.0 171.2

【0024】表2および表3から、個人差はあるものの、上記で得た菌粉末を投与すると、IFN $\alpha$ 産生、IFN $\gamma$ 産生、NK活性、2-5A酵素活性に対しても向上させる効果があることが明確である。なお、下記血液検査パラメーターについて投与後の各人の変化を調べたが、各人とも特に基準値からずれるような大きな変動は認められなかった。勿論投与後IFN $\alpha$ 産生能が低下した個体についても同様に変動は認められなかった。

## 【0025】

【発明の効果】本発明にかかる免疫機能助長剤は、以上のように、投与することで人体内のIFN $\alpha$ 産生、IFN $\gamma$ 産生、NK活性、2-5A活性を高め、免疫機能を助長することができる。しかも、従来、人体内にも存在する乳酸菌の一種を用いることで副作用もない。

【0026】したがって、安全に感染症や腫瘍の治療と予防を行うことができる。